

尿路感染防御機構の研究 標識糖鎖を用いた大腸菌 線毛adhesinの検出

著者	伊藤 晋
号	2467
発行年	1992
URL	http://hdl.handle.net/10097/20809

氏 名（本籍） い とう しん
伊 藤 晋

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 2 4 6 7 号

学位授与年月日 平 成 4 年 9 月 9 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 60 年 3 月 26 日
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 尿路感染防御機構の研究
標識糖鎖を用いた大腸菌線毛 adhesin の検出

（主 査）

論文審査委員 教授 折 笠 精 一 教授 今 野 多 助

教授 菅 村 和 夫

論文内容要旨

感染防御機構に打ち勝って尿路感染症が成立する為には、細菌の尿路上皮への付着が重要である。この付着は、細菌の線毛等に存在する adhesin が尿路上皮細胞膜の糖鎖レセプターに特異的に結合する事によって発現する。これまで大腸菌の type 1 線毛や P 線毛については血球凝集試験、電子顕微鏡、抗線毛抗体などを用いた研究がなされてきた。しかしこれらの方法は、実際に発症している感染の場での各々の細菌の状態を必ずしも反映していない。

そこでこれらの欠点を除き、感染症における線毛の働きを詳細に検討する目的で、採取した検体を培養する事なく、個々の菌における adhesin の発現や菌体の中での局在を検出でき、線毛の抗原性変化などに影響を受けない検出法として、トリチウム及び金コロイド標識レセプターによる adhesin の検出を試み、従来の血球凝集試験やラテックス凝集試験と比較した。

トリチウム標識マンノースを用いたオートラジオグラフィーによっては adhesin は検出できなかったが、これは標識マンノースの specific activity や adhesin に付着する標識マンノースの数が検出限界以下であったためと考えられた。

金コロイド標識レセプターとして type 1 線毛のレセプターを含む Mannose- α -(1,6) [Mannose- α -(1,3)]-Mannose- α -O-BSA-Gold colloidal particles を用いた。細菌を室温で10%金コロイド液で24時間処理し、ネガティブ染色後に透過型電子顕微鏡で観察した。

尿路感染症起炎大腸菌23株の検討では、金コロイド粒子は主に大腸菌の線毛に接して認められた。この金コロイドの付着は、糖鎖を含まない BSA-Gold colloidal particles では認められない点、Mannose- α -(1,6) [Mannose- α -(1,3)]-Mannose- α -O-BSA-Gold colloidal particles の付着は細菌をあらかじめマンノースで処理することによって減少するが、グルコース処理では影響を受けない点等よりマンノースを含む糖鎖と細菌の adhesin との特異的な付着であると考えられた。

個々の菌での金粒子付着の程度を（－）、（±）、（＋）、（＋＋）の4段階に分類して評価すると、同一の菌株の中でも個々の細菌により金粒子の付着は大きく異なっているが、菌株全体としては従来の血球凝集試験の結果と良く一致した。すなわち、マンノース感受性血球凝集（MSHA）陰性群は殆どの菌が金付着（＋）以下にあり、MSHA 陽性群、特に HA titer が7以上の“high HA titer”群では大部分が（＋）以上となった。統計学的にも、MSHA 陰性群と陽性群間で、“high HA titer”群と“Low HA titer”群（HA titer が6以下）間で、それぞれ有意差（ $P<0.001$ ）が認められた。更に MSHA 陰性株にも金コロイドの付着が（＋）の菌を認めたことは、凝集を示さない菌株の中にも adhesin を弱く発現している個体が存在することを意味する

と考えた。

個々の細菌における金粒子の局在をみると、多くは線毛に分布し、あるいは線毛のない細胞表面にも付着している様に観察された。特定の線毛の特定の部位に金粒子が密集している像も観察された。また、23株のうち2株では、線毛構造を発現していないにもかかわらず、細胞表面に多くの金粒子の付着を認めた。これは線毛の構造は有していないが、adhesinを細胞表層に有している状態 (afimbrial adhesin) ではないかと推測された。afimbrial adhesinの感染における意義については不明であるが、今回の様な方法を用いることによって更に詳細な検討が可能になると考えられる。

P線毛のレセプターを含む Galactose- α -(1,4)-Galactose- β -(1,4)-N-acetylglucosamine- β -O-BSA-Gold colloidal particlesを用いた検討は大腸菌6株で行ったが、(+)以上の金粒子付着を認めるのは4株で、マンノース抵抗性血球凝集試験 (MRHA) の結果やラテックス凝集試験の結果とほぼ一致する結果であった。

また、5nmと15nmといった粒子径の異なる金コロイドを用いることで、type 1線毛 (adhesin) とP線毛 (adhesin) を同時に検出することも可能であった。

本法の結果は、従来の血球凝集試験やラテックス凝集試験による線毛の検出結果とも相関し、更に鋭敏に個々の細菌の adhesin 発現や局在について検出できた。

審 査 結 果 の 要 旨

近年、尿路感染症のみならず気道感染症や腸管感染症においても、細菌の粘膜上皮への付着が感染発現に重要な因子として研究が進められている。この付着は細菌の線毛、その中でも adhesin と云われる蛋白が上皮細胞細胞膜の糖鎖レセプターに特異的に結合することによって発現すると考えられている。

本教室では、尿路感染症の発症機序および尿路の感染防御機構について研究を重ねてきた。細菌の付着に関しては、大腸菌 1 型線毛のレセプターであるマンノースが尿中にも存在し、その微量のマンノースが大腸菌 1 型線毛の付着を阻止できることを示した。

これまでの研究では、線毛を血球凝集反応によって検出しているものが多い。血球凝集試験を行うためには、分離した菌を培養して菌数を増やす必要があるが、培養により phase variation で線毛の発現状況は変化し、培養後の線毛発現は必ずしも実際に発症している感染の場での状態をそのまま反映しているとは限らない。また、血球凝集反応による線毛検出は菌株全体としての線毛発現を見るもので、個々の菌の線毛発現を検出できない。

これらの点を改善した検査法として抗線毛抗体を用いた研究があるが、抗線毛抗体は線毛の構造蛋白を認識している可能性が高く、必ずしもレセプター認識部位である adhesin を認識するとは限らない。

本論文では、これらの問題点を解決し、感染症における線毛の働きを詳細に検討する目的で、採取した検体を培養する事なく、個々の菌における adhesin の発現や菌体の中での局在を検出でき、線毛の抗原性変化などに影響を受けない検出法として、金コロイド標識レセプターによる adhesin の検出を試み、従来の血球凝集試験やラテックス凝集試験と比較した。

金コロイド標識レセプターを用いて、電子顕微鏡的に観察することで、大腸菌 1 型線毛および P 線毛を検出できた。金粒子付着の程度は、従来から線毛検出法として行われている血球凝集試験あるいはラテックス凝集試験と全体として良く一致したが、同一の菌株内の個々の菌により金粒子付着の程度は大きく異なっており、凝集を示さない菌株の中にも adhesin を発現している個体が存在することを検出した。また、adhesin が線毛の特定の部位には局在せず、線毛や細胞表層に分布するのが観察された。尿路感染症起炎大腸菌 23 株中 2 株では、線毛が観察されないにもかかわらず、細胞表層に金コロイド粒子の付着が認められ、マンノース感受性 afimbrial adhesin と推定される結果であった。

以上のように、本論文は尿路感染症の成立機序を解明する目的で、尿路上皮への細菌付着に関与している adhesin 発現の新しい検出方法を確立した研究で、独創的であり、尿路感染症における研究として高く評価されるものである。よって、学位を授与するに価するものと認める。